

# 成長期のカルシウム (Ca) とたんぱく質摂取量が 成獣ラットの高脂肪食摂取時の脂質代謝に及ぼす影響

星 清 子\*

Effects of protein and calcium intake levels during their growth period  
on lipid metabolism in adult rats fed high-fat diet.

Seiko Hoshi

離乳直後のSD系ラットのCaとたんぱく質の摂取量が成長後の脂質代謝に及ぼす影響を検討した。飼料中のCa含有量(0.5%または0.1%)とたんぱく質含有量(20%または10%)を要因とする二元配置分散分析(2×2)で計4群を設定した。飼料中Caの0.5%含量およびたんぱく質の20%含量がAIN-93Gに準じた標準状態である。これらの条件で3～10週齢(成長期)は5%脂肪食(標準)、11週齢(成獣期)以降は20%脂肪食の高エネルギー食を与え、19週齢の終わりに解剖した。その結果、低Ca/低たんぱく質食はラットの体重増加を著しく抑制し、特に、除脂肪体重と大腿骨重量が低かった。低Ca食のラットは標準Ca食に比べて、空腹時血漿トリアシルグリセロール濃度が高かった。さらに肝臓重量も重く、肝脂質量も有意に高かった。以上の結果から、幼仔期から長期にわたるCaの摂取不足は脂質代謝異常を引き起こす可能性が高く、そして、低たんぱく質食によってさらに増悪することが明らかとなった。

キーワード: カルシウム (Ca)、たんぱく質、脂質代謝、体脂肪、メタボリックシンドローム

平成20年の国民健康・栄養調査<sup>1)</sup>において40～74歳の男性の2人に1人、女性の5人に1人がメタボリックシンドロームを強く疑われる者または予備群であったと報告されている。肥満は糖尿病、高血圧症、脂質異常症等メタボリックシンドロームの中核的な病因であり、有病者も年々増加している。一方、幼児・学童期の肥満が顕在化し、大きな健康問題の一つにもなっている。特に、9～11歳男児において肥満、太り気味の者の割合が昭和55年の調査で19.8%であったのに対し、平成18年には28.5%と大きく増加した(平成18年国民健康・栄養調査<sup>2)</sup>)。幼児・学童

期の肥満が成人の肥満に移行しやすいと言われて、その割合は80%に及ぶという統計結果もあり<sup>3)</sup>、将来のメタボリックシンドローム罹患が懸念される。

近年、多くの国内外の公衆栄養学的研究によって乳またはカルシウム(Ca)の摂取量と体重との間に負の相関関係が報告されている<sup>4)～6)</sup>。摂取Ca量と細胞内Ca濃度は負の相関関係にあり、脂肪細胞内のCa濃度は脂肪合成や分解の調整に密接にかかわっていることも培養細胞や動物実験において明らかになってきた。さらに、Caによる体脂肪の低減作用は乳成分によって増強されることが公

2013年9月9日受理

\* 尚綱学院大学 准教授

衆栄養学的観察研究や介入研究、動物試験などで報告されているが、メカニズムは明らかではない<sup>7)~8)</sup>。脂肪細胞はレニン・アンジオテンシン系の基質であるアンジオテンシンノーゲンも産生し、続いて産生されるアンジオテンシンⅡは脂肪細胞の分化（小型化）を抑制して脂肪細胞を脂肪が蓄積した大型細胞にし、脂肪細胞の機能に影響を与えるという報告もある。大型化した脂肪細胞はインスリン感受性に影響をもたらす様々なアディポサイトカインを産生することが明らかになっている。そして、乳成分、特にホエイによってアンジオテンシンノーゲンの産生が抑制される可能性も報告されている<sup>5)</sup>。

また、最近、脂肪細胞の代謝に骨芽細胞も大きな影響をもたらす等、骨と脂肪細胞の関連も報告されている<sup>8)</sup>。これらの報告から、成長の著しい成長期の骨代謝、すなわち骨の栄養状態がエネルギー代謝に深く関わっていることが推測される。

平成19年の国民健康栄養調査<sup>9)</sup>において1-6歳の乳類平均摂取量は199.3g/日、Caは421mg/日と報告され、2010年度の食事摂取基準のCa摂取推奨量（1-2歳で430mg/日、3-5歳で585mg/日）を大きく下回っている。さらに平成7年に国立健康・栄養研究所が公表した「健康・栄養情報基盤データ」によると1-6歳の平均乳類摂取量は202.4 ± 180.1g/日（平均値 ± 標準偏差）であり、約90%の変動値を示している。これらの結果は、Caの主要な供給源である乳類を充分量摂取している幼児もいるが、一方では摂取量が極めて不足している幼児が潜在している現状を表している。

そこで本研究では、骨塩量の増加に伴いCa体内蓄積量の増加量がもっとも高くなる成長期におけるCaとたんぱく質摂取量の充足と不足の栄養環境が成長後の脂質代謝に及ぼす影響を検討することを目的とした。

## 実験方法

### 1. 実験デザイン

実験動物には、3週齢Sprague Dawley系の雄ラット24匹を日本チャールスリバー（株）より購入して用いた。市販固型飼料（MF、オリエンタル酵母（株））にて3日間、環境に馴化させた後、24匹を体重の群平均が同じになるように6匹ずつ4群に分けた。実験群は、飼料中のCa含有量（0.5%または0.1%）とたんぱく質含有量（20%または10%）を要因とする二元配置分散分析（2 × 2）で、以下の4群（①～④）を設定した。

① 0.1% Ca・10%たんぱく質食群（LCLP）

② 0.5% Ca・10%たんぱく質食群（SCLP）

③ 0.1% Ca・20%たんぱく質食群（LCSP）

④ 0.5% Ca・20%たんぱく質食群（SCSP）

上記各群の試験食組成を表1に示した。飼料中のCa含有量は、0.5%（以下、SC食）がAIN-93G<sup>10)</sup>に準拠した標準Ca食で、0.1%（以下、LC食）がCa摂取不足の状態となる低Ca食である。一方、たんぱく質含有量は、20%（以下、SP食）がAIN-93G<sup>10)</sup>に準拠した標準たんぱく質食で、10%（以下、LP食）がたんぱく質摂取不足の状態となる低たんぱく質食である。

実験は、成長期（3～9週齢の終わり、実験1）と成獣期（10～19週齢、実験2）の2期に分けた。実験1では、脂質含量5%の標準エネルギー食（5%脂肪食）を与え、実験2では脂質含量20%の高エネルギー食（20%脂肪食）を与えた（表1）。

飼育は室温25 ± 2℃、12時間の明暗交替（明期：8:00～20:00、暗期20:00～8:00）の環境下で行った。食餌と飲水（蒸留水）は自由摂取させた。毎日、体重と摂食量を測定して飼料効率（エネルギー効率とたんぱく質効率）を算出した。

19週齢で一晩絶食させたラットをエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より採血後、各

星：成長期のカルシウム（Ca）とたんばく質摂取量が成獣ラットの高脂肪食摂取時の脂質代謝に及ぼす影響

表1 実験群および試験飼料組成

(g/kg)								
群	実験1(成長期)				実験2(成獣期)			
	LCLP	SCLP	LCSP	SCSP	LCLP	SCLP	LCSP	SCSP
たんばく質レベル	10% (LP)		20% (SP)		10% (LP)		20% (SP)	
Caレベル	0.1% (LC)	0.5% (SC)	0.1% (LC)	0.5% (SC)	0.1% (LC)	0.5% (SC)	0.1% (LC)	0.5% (SC)
カゼイン	100	100	200	200	100	100	200	200
α-コーンスターチ	652.5	642.5	552.5	542.5	502.5	492.5	402.5	392.5
シュクロース	100	100	100	100	100	100	100	100
大豆油	50	50	50	50	50	50	50	50
ラード	0	0	0	0	150	150	150	150
セルロース	50	50	50	50	50	50	50	50
Ca除去ミネラル混合 *1	35	35	35	35	35	35	35	35
炭酸カルシウム	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5
ビタミン混合 *2	10	10	10	10	10	10	10	10

\*1 炭酸カルシウムを含まない AIN-93G ミネラル混合

\*2 重酒石酸コリンを含む AIN-93 ビタミン混合

臓器を摘出し、重量を測定した。本実験では、摘出した臓器（肝臓、脾臓、腎臓、副腎、心臓、生殖器、消化管）と脂肪組織（腎周囲脂肪、副睾丸脂肪、腸間膜脂肪、皮下脂肪）を体重から差し引いたものを空体重とした。また、骨格筋として両足の腓腹筋を、骨重量として両足の大腿骨重量を測定した。

尚、本実験は「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日、環境省告示第88号）並びに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（2006年6月1日、日本学術会議）に従って実施した。

## 2. 脂質の見かけの消化吸収率の測定

実験1では、5%脂肪食の試験食を与えてから4週間目の7週齢時、実験2では、20%脂肪食の試験食を与えてから6週間目の16週齢時に各群から5匹のラットを選出して代謝ケージに移し、5日間の出納試験を行った。

採集した5日間の糞は凍結乾燥後、重量を測定して、分析時まで-30℃に保存した。分析時に乾燥糞を粉碎し、クロロホルム：メタノール（2：1）混液を用いた Folch 法<sup>11)</sup>

により糞中総脂質を抽出し、溶媒を留去して恒量を測定した。5日間の脂質摂取量から糞中総脂質量を差し引いて、見かけの脂質消化吸収率を算出した。

## 3. 血液生化学分析

実験1では、20%脂肪食に切り替える直前（10週齢）に一晩絶食したラットの尾静脈より採血した。実験2では、20%脂肪食の摂取から66日目（19週齢）に一晩絶食後、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈より採血した。得られたそれぞれの血漿は、分析時まで-80℃に保存した。

血漿Ca濃度はカルシウムE-テストワコー、血漿遊離脂肪酸（NEFA）濃度はNEFA C-テストワコー、血漿トリアシルグリセロール（TG）濃度はトリグリセライドE-テストワコー（いずれも和光純薬工業（株））を用いて測定した。

## 4. 肝臓脂質量の測定

肝臓は、摘出後、直ちにドライアイス上で凍結し、分析時まで-80℃に保存した。クロロホルム：メタノール（2：1）混液を用

いた Folch 法<sup>11)</sup>により肝臓総脂質を抽出し、溶媒を留去して恒量を測定した。

## 5. 統計解析

飼料効率、見かけの脂質消化吸収率、および血液生化学分析結果は、週齢（10 週齢、19 週齢）または飼料中の脂質レベル（5 %、20 %）、Ca レベル（0.1 %、0.5 %）ならびにたんぱく質レベル（10 %、20 %）を要因とする三元配置分散分析（ $2 \times 2 \times 2$ ）、解剖時の体重、臓器重量は飼料中の Ca レベル（0.1 %、0.5 %）とたんぱく質レベル（10 %、20 %）を要因とする二元配置分散分析（ $2 \times 2$ ）を行った。データは平均値と標準偏差（SD）で示し、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。統計解析には、JMP9.03 (SAS Institute 社) を用いた。

## 結果

### 1. 体重増加量、飼料摂取量および飼料効率

5 % 脂肪食による実験 1（成長期）と 20 % 脂肪食による実験 2（成獣期）の体重増加量、および飼料効率とたんぱく質効率を表 2 に示した。

飼料摂取量と体重増加量は、実験 1 と実験 2 の実験全期間を通して、低たんぱく質（LP）群で有意に低値を示した。また、LP 群のたんぱく質効率は標準たんぱく質（SP）群に比べて有意に高値を示したが、飼料効率は有意に低かった。

体重増加量および飼料効率に Ca 摂取量による影響はなかった。

### 2. 脂質の見かけの消化吸収率

脂質の見かけの消化吸収率を表 3 に示した。5 % 脂肪食による実験 1 では、SP 群に比べて LP 群の糞中への脂質排泄量が有意に多かったため、脂質の見かけの消化吸収率が低くなった。Ca 摂取量の違いによる脂質の

見かけの消化吸収率への影響はなかった。一方、20 % 脂肪食摂取時の見かけの消化吸収率には、たんぱく質摂取量、Ca 摂取量、いずれの影響もなかった。

### 3. 肝臓重量、体脂肪量および除脂肪体重

19 週齢で解剖して摘出した肝臓重量を図 3 に、体脂肪量、除脂肪体重および腓腹筋重量を表 4 に、大腿骨重量を表 5 に示した。

LP 群の肝臓重量は、SP 群に比べて有意に低値を示した。Ca 摂取量で比較すると、低 Ca（LC）群のラットの肝臓重量は、標準カルシウム（SP）群に比べて有意に高値を示した。空体重あたりの相対重量もまた、LP < SP、LC > SC であった。

総体脂肪重量は SP 群に比べて LP 群で有意に低かった。皮下脂肪蓄積量には飼料による統計的な有意差がないことから、総体脂肪重量の差異は主に内臓脂肪蓄積量の差によるものであった。体脂肪の蓄積量に対する Ca 摂取量の影響はなかった。一方、体重から総体脂肪量を差し引いて算出した除脂肪体重は SP 群に比べて LP 群が有意に低く、低 Ca 食（LC 群）でさらに低くなった。

LP 群の腓腹筋重量は SP 群に比べて低値を示したが、Ca 摂取量による影響はなかった。空体重あたりの相対重量で腓腹筋重量を比較すると飼料による差異はなかった。

大腿骨重量は SP 群に比べて LP 群で低く、LC 食によってさらに低値を示した。1 cm あたりの骨重量もまた LP 群で低く、LC 群でさらに低値となった。

星：成長期のカルシウム（Ca）とたんばく質摂取量が成獣ラットの高脂肪食摂取時の脂質代謝に及ぼす影響

表2 体重、体重増加量、飼料摂取量および飼料効率

群	LCLP	SCLP	LCSP	SCSP	二元配置 分散分析結果 (P)		
たんばく質レベル (P)	10%		20%				
カルシウムレベル (Ca)	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	P	Ca	P × Ca
初体重 (g)	63.1 ± 4.5	63.1 ± 3.6	63.2 ± 3.5	63.1 ± 3.1	NS	NS	NS
実験1 終体重 (g)	221.2 ± 28.6	224.0 ± 29.2	325.1 ± 14.8	341.5 ± 13.1	<0.0001	NS	NS
実験2 終体重 (g)	403.8 ± 58.2	424.4 ± 65.2	555.4 ± 37.0	609.5 ± 30.1	<0.0001	NS	NS
実験1 体重増加量 (g/45日)	158.1 ± 26.0	160.9 ± 27.7	261.8 ± 14.8	278.4 ± 11.5	<0.0001	NS	NS
実験2 体重増加量 (g/65日)	178.8 ± 32.9	193.7 ± 35.7	226.8 ± 23.7	259.5 ± 22.5	<0.0001	NS	NS
実験1 飼料摂取量 (g/45日)	597.5 ± 65.5	616.2 ± 72.9	684.2 ± 6.2	688.5 ± 6.2	<0.001	NS	NS
実験2 飼料摂取量 (g/65日)	1048 ± 110.1	1144 ± 132	1197 ± 55.6	1281 ± 4.1	0.001	0.025	NS
実験1 飼料効率 (g体重増加量/g摂取飼料)	0.263 ± 0.020	0.260 ± 0.028	0.382 ± 0.020	0.403 ± 0.014	<0.0001	NS	NS
実験2 飼料効率 (g体重増加量/g摂取飼料)	0.167 ± 0.015	0.167 ± 0.018	0.188 ± 0.013	0.200 ± 0.019	<0.001	NS	NS
実験1 たんばく質効率 (g体重増加量/g摂取たんばく質)	2.70 ± 0.13	2.63 ± 0.30	2.00 ± 0.09	2.08 ± 0.07	<0.0001	NS	NS
実験2 たんばく質効率 (g体重増加量/g摂取たんばく質)	1.69 ± 0.15	1.69 ± 0.17	0.95 ± 0.06	1.01 ± 0.09	<0.0001	NS	NS

\* 実験1 (成長期、3-9週齢) は5%脂肪食、実験2 (成獣期、10-19週齢) は20%脂肪食を自由摂取させた。

数値は平均値 ± 標準偏差を表す。NS: 統計的に有意差がないことを表す (p > 0.05)。

※ 飼料効率の三元配置分散分析結果: 実験期間 (E) p < 0.0001、たんばく質レベル (P) p < 0.001、カルシウムレベル (Ca) NS、  
E × P p < 0.001、F × Ca NS、P × Ca NS、F × P × Ca NS

※ たんばく質効率の三元配置分散分析結果: 実験期間 (E) p < 0.0001、たんばく質レベル (P) p < 0.001、カルシウムレベル (Ca) NS、  
E × P NS、F × Ca NS、P × Ca NS、F × P × Ca NS

表3 5日間の脂質摂取量、排泄量および見かけの消化吸収率

群	LCLP	SCLP	LCSP	SCSP	二元配置 分散分析結果 (P)		
たんばく質レベル (P)	10%		20%				
カルシウムレベル (Ca)	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	P	Ca	P × Ca
実験1 (7週齢、5%脂肪食)							
脂質摂取量 (g/5日)	3.52 ± 0.53	3.81 ± 0.56	3.78 ± 0.50	3.95 ± 0.50	NS	NS	NS
脂質排泄量 (g/5日)	0.13 ± 0.029	0.10 ± 0.042	0.14 ± 0.013	0.16 ± 0.034	<0.05	NS	NS
見かけの脂質消化吸収率 (%)	98.4 ± 1.93	97.4 ± 1.18	96.3 ± 0.44	95.9 ± 1.00	<0.05	NS	NS
実験2 (16週齢、20%脂肪食)							
脂質摂取量 (g/5日)	14.1 ± 1.93	17.8 ± 1.45	14.2 ± 1.68	17.9 ± 0.87	NS	<0.0001	NS
脂質排泄量 (g/5日)	0.16 ± 0.023	0.25 ± 0.107	0.14 ± 0.047	0.21 ± 0.080	NS	<0.05	NS
見かけの脂質消化吸収率 (%)	98.8 ± 0.20	98.6 ± 0.52	99.0 ± 0.31	98.8 ± 0.41	NS	NS	NS

数値は平均値 ± 標準偏差を表す。NS: 統計的に有意差がないことを表す (p > 0.05)。

※ 見かけの脂質消化吸収率の三元配置分散分析結果: 試験食脂質レベル (F) p < 0.0001、たんばく質レベル (P) p < 0.01、  
カルシウムレベル (Ca) NS、F × P p < 0.01、F × Ca NS、P × Ca NS、F × P × Ca NS

※ 実験1では、5%脂肪食の試験食を与えてから4週間目の7週齢時、実験2では、20%脂肪食の試験食を与えてから6週間目の16週齢時に  
各群5匹のラットについて、代謝ケージを用いて5日間の出納試験を行った。

表 4 体脂肪、除脂肪体重および腓腹筋重量

群	LCLP	SCLP	LCSP	SCSP	二元配置 分散分析結果 (P)		
たんばく質レベル (P)	10%		20%				
カルシウムレベル (Ca)	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	P	Ca	P × Ca
(g)							
総体脂肪量	56.4 ± 31.9	45.7 ± 14.1	74.7 ± 11.5	78.7 ± 11.0	<0.05	NS	NS
皮下脂肪	28.7 ± 20.4	21.0 ± 5.8	32.2 ± 8.1	31.8 ± 7.0	NS	NS	NS
内臓脂肪	27.8 ± 12.3	24.7 ± 10.6	42.6 ± 3.9	46.9 ± 8.8	<0.0001	NS	NS
腎周囲脂肪	13.6 ± 6.3	11.9 ± 5.2	19.0 ± 2.4	22.0 ± 4.7	<0.001	NS	NS
副睾丸周辺脂肪	6.6 ± 2.8	6.2 ± 3.4	12.7 ± 2.3	12.2 ± 1.8	<0.0001	NS	NS
腸間膜脂肪	7.5 ± 3.6	6.7 ± 2.3	10.9 ± 1.4	12.7 ± 3.0	<0.001	NS	NS
除脂肪体重	342.6 ± 35.9	369.5 ± 52.2	473.7 ± 40.4	519.2 ± 34.0	<0.0001	<0.05	NS
腓腹筋(両足)	4.7 ± 0.4	5.4 ± 0.6	6.3 ± 0.4	7.3 ± 1.3	<0.05	NS	NS
(g/100g空体重*)							
総体脂肪量	16.8 ± 8.0	13.3 ± 2.7	17.1 ± 3.1	16.2 ± 2.7	NS	NS	NS
皮下脂肪	8.5 ± 5.3	6.2 ± 1.4	7.4 ± 2.1	6.5 ± 1.3	NS	NS	NS
内臓脂肪	8.4 ± 3.0	7.1 ± 2.3	9.7 ± 1.1	9.7 ± 2.3	<0.05	NS	NS
腎周囲脂肪	4.1 ± 1.6	3.4 ± 1.2	4.3 ± 0.7	4.6 ± 1.2	NS	NS	NS
副睾丸周辺脂肪	2.0 ± 0.7	1.8 ± 0.8	2.9 ± 0.4	2.5 ± 0.4	<0.05	NS	NS
腸間膜脂肪	2.3 ± 0.9	1.9 ± 0.4	2.5 ± 0.4	2.6 ± 0.7	NS	NS	NS
腓腹筋(両足)	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2	NS	NS	NS

数値は平均値 ± 標準偏差を表す。NS: 統計的に有意差がないことを表す (p > 0.05)。

\* 体重から抽出した肝臓、脾臓、腎臓、副腎、心臓、生殖器、消化管および脂肪組織を差し引いたものを空体重とした。

表 5 大腿骨重量

群	LCLP	SCLP	LCSP	SCSP	二元配置 分散分析結果 (P)		
たんばく質レベル (P)	10%		20%				
カルシウムレベル (Ca)	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	P	Ca	P × Ca
大腿骨重量(両足) (g)	0.90 ± 0.08	1.10 ± 0.12	1.23 ± 0.14	1.47 ± 0.15	<0.0001	<0.001	NS
大腿骨長 (cm)	3.50 ± 0.15	3.70 ± 0.17	4.02 ± 0.20	4.16 ± 0.15	<0.0001	<0.05	NS
大腿骨幅 (cm) *	0.32 ± 0.10	0.40 ± 0.09	0.43 ± 0.10	0.45 ± 0.09	<0.05	NS	NS
長さあたりの骨重量 (g/cm)	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.35 ± 0.03	<0.001	<0.01	NS

数値は平均値 ± 標準偏差を表す。NS: 統計的に有意差がないことを表す (p > 0.05)。

\* 大腿骨の幅は、縦長の中間点の幅を測定した。



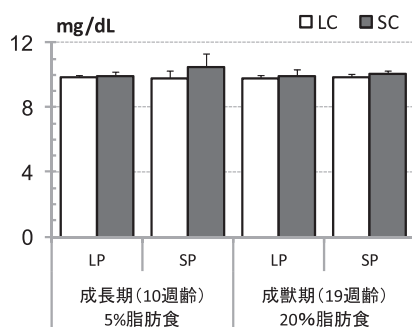


図1 血漿カルシウム濃度

一晚絶食したラットの尾静脈から採血し、値は平均値±SDで示した。  
 LC：0.1% Ca食、SC：0.5% Ca食、  
 LP：10% たんぱく質食、SP：20%たんぱく質食  
 三元配置分散分析結果：週齢×Caレベル×たんぱく質（P）レベル  
 週齢 NS、Ca  $p < 0.01$ 、P NS、週齢×Ca NS、週齢×P NS、  
 Ca×P NS、週齢×Ca×P NS  
 二元配置分散分析結果：Caレベル×たんぱく質（P）レベル  
 10週齢（5%脂肪食）：Ca  $p < 0.05$ 、P NS、Ca×P NS  
 19週齢（20%脂肪食）：Ca NS、P NS、Ca×P NS  
 NS：統計的有意差がないことを示す（ $p > 0.05$ ）

#### 4. 血漿カルシウム濃度と脂質濃度

血漿Ca濃度を図1に、一晚絶食後の血漿脂質（トリアシルグリセロール（TG）、遊離脂肪酸（NEFA））濃度を図2に示した。

血漿Ca濃度は、実験期間を通してLC群で有意に低値を示した。血漿脂質濃度はSC群に比べてLC群の空腹時血漿TG濃度が高かった。特に成長期（10週齢）のLP群はCa摂取量に関係なく空腹時TG濃度が有意に高かった。一方、血漿NEFA濃度は、成獣期（19週齢）に比べて成長期（10週齢）で高く、LP群で特に高かった。Ca摂取量による統計的な有意差はなかった。

#### 5. 肝臓脂質

肝臓脂質量を図3に示した。肝臓脂質量および肝臓脂質濃度はいずれもSC群に比べてLC群で有意に高かった。一方、LP群に比べてSP群の肝臓脂質量は高かったが、肝臓脂質濃度に差がなかった。これは、肝臓重量が

LP群よりもSP群で重かったためと考えられた。

#### 考察

離乳直後からCaとたんぱく質が不足した栄養環境で飼育されたラットは、成獣になってから高エネルギー飼料を摂取したにも関わらず、体重増加量が少なく、体重が軽かった（表2）。低たんぱく質食のLP群のラットはSP群と比べて、体脂肪、特に内臓脂肪の蓄積量と除脂肪体重が有意に低値を示した（表4）。一方、低Ca食によるLC群のラットはSC群と比べて、体脂肪蓄積量に違いがなかったが、除脂肪体重を低下させた（表4）。飼料効率は低たんぱく質食によってのみ低下し、Ca摂取量の影響はなかった（表2）。

Papakonstantinouら<sup>12)</sup>は、ラットに0.4% Ca食、または2.4% Ca食を85日間与え、2.4% Ca食において排泄糞量の増加とエネルギー吸収率の減少を報告した。これは、脂質の消化過程で産生された脂肪酸とCaが消化管内で不溶性の塩を形成し、糞へ排泄されることによって消化管からの脂質吸収が抑制されたためと説明されている。本実験では、5%脂肪食による実験1および20%脂肪食による実験2の両期間において、見かけの脂質消化吸収率にCa摂取量による有意な差はなかった（表3）。従って、本実験において、飼料効率にCa摂取量の影響がなかったことからCaによる脂質の吸収阻害はなかったと考えられた。そして、低Ca食による除脂肪体重の低下はラットの摂取量の減少によるものと考えられた。一方、低たんぱく質食はラットの摂取量を著しく低下させただけでなく、飼料効率を低下させ、ラットの成長や体重増加に著しい負の影響をもたらした。

19週齢（成獣期）で摘出した大腿骨の重量は、低Ca食および低たんぱく質食によって有意な低値を示した（表5）。低Ca食によっ

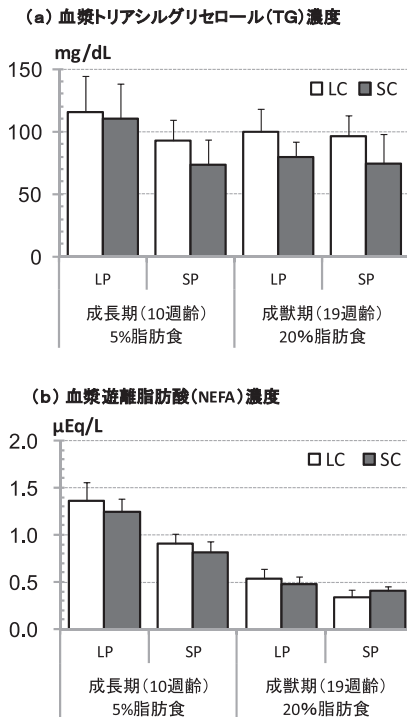


図2 血漿トリアシルグリセロール濃度と遊離脂肪酸濃度

一晚絶食したラットの尾静脈から採血し、値は平均値±SDで示した。

LC: 0.1% Ca食、SC: 0.5% Ca食、

LP: 10% たんぱく質食、SP: 20%たんぱく質食

三元配置分散分析結果: 週齢×Caレベル×たんぱく質 (P) レベル

(a) TG: 週齢 NS、Ca  $p<0.01$ 、P  $p<0.01$ 、週齢×Ca NS、週齢×P  $p<0.05$ 、Ca×P NS、週齢×Ca×P NS

(b) NEFA: 週齢  $p<0.0001$ 、Ca NS、P  $p<0.0001$ 、週齢×Ca NS、週齢×P  $p<0.0001$ 、Ca×P NS、週齢×Ca×P NS

二元配置分散分析結果: Ca レベル×たんぱく質 (P) レベル

(a) TG: 10 週齢 (5%脂肪食): Ca NS、P  $p<0.001$ 、Ca×P NS 19 週齢 (20%脂肪食): Ca  $p<0.01$ 、P NS、Ca×P NS

(b) NEFA: 10 週齢 (5%脂肪食): Ca NS、P  $p<0.0001$ 、Ca×P NS 19 週齢 (20%脂肪食): Ca NS、P  $p<0.01$ 、Ca×P NS

NS: 統計的有意差がないことを示す ( $p>0.05$ )

て大腿骨の長さが縮小し、低たんぱく質食は大腿骨の長さ太さ(幅)を縮小した。本実験において、骨密度は測定していないが、大腿骨の長さあたりの重量がLC群とLP群で有意な低値を示したことから、幼仔期からの低Ca摂取量と低たんぱく質摂取量は骨の発育に負の影響を及ぼした。

一方、LC群の血漿Ca濃度はSC群と比べて、成獣期の実験2では統計的有意差がなかったが、成長期の実験1で有意に低かった(図1)。血漿Ca濃度が低下すると、副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌が促進され、活性型ビタミンD ( $1\alpha$ - $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )の合成が増加する。活性型ビタミンDの作用により、Caの腸管吸収、尿細管からの再吸収、および骨吸収が促進され、血中Ca濃度は一定濃度に調節される。成長期の実験1では、ラットのCa必要量が高いため、血漿Ca濃度を一定濃度に維持するために0.1% Ca食ではCaが不足状態であったと考えられる。そして、19週齢に摘出した大腿骨重量がLC群で有意に低値であったことから(表5)、本実験における0.1% Ca食の条件は幼仔期、成獣期を通して極度のCa不足の状態であったことが明らかである。

Zemelら<sup>13)~14)</sup>は、Ca摂取量が低下するとPTHの分泌が増加し、活性型ビタミンDの合成が高まり、腸管からのCa吸収や腎臓からのCaの再吸収が促進されるだけでなく、脂肪細胞と脾細胞にも活性型ビタミンDが作用し、脂肪細胞と脾細胞でも $\text{Ca}^{2+}$ の流入が高まることを報告した。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇すると、脂肪細胞では脂肪酸合成酵素の遺伝子発現と活性が増加して脂肪分解が抑制される。一方、脾細胞では、インスリンの分泌が促進される。そして、インスリンを介して脂肪細胞の脂肪酸合成が促進され、脂肪分解も抑制される。この状態が長く続くと、脂肪細胞は脂質を多量に蓄積して肥大化し、肥大化した脂肪細胞からメタボリックシンドロームの発症原因となる様々なアディポサイトカインの放出が増加するとZemelら<sup>13)~14)</sup>は説明している。

Shinokiら<sup>15)</sup>は、離乳直後のラットを本実験と同等の0.5% Ca食、または0.1% Ca食で4週間飼育したラットから摘出した脂肪細胞にin vitroでアドレナリン刺激を与え、脂肪



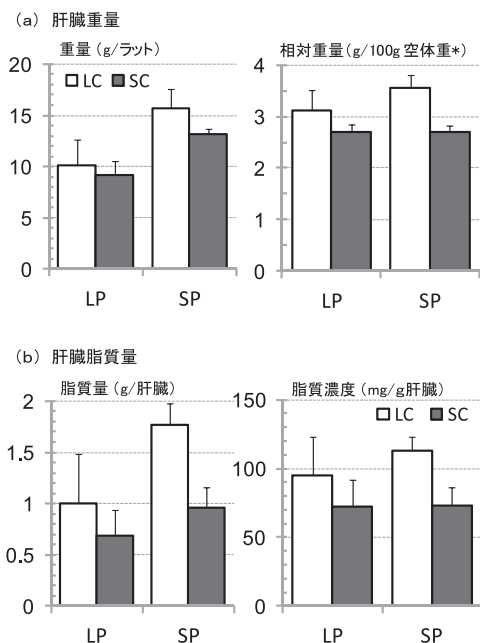


図3 肝臓重量と肝臓脂質量

20%脂肪食を摂取した19週齢ラットを一晩絶食させた後、解剖し肝臓を摘出した。値は平均値±SDで示した。

LC：0.1% Ca食、SC：0.5% Ca食、

LP：10% たんぱく質食、SP：20%たんぱく質食

\* 体重から摘出した肝臓、脾臓、腎臓、心臓、生殖器、消化管および脂肪組織を差し引いたものを空体重とした。

二元配置分散分析結果：Ca レベル×たんぱく質 (P) レベル

(a) 肝臓重量

重量：Ca  $p < 0.05$ , P  $p < 0.0001$ , Ca×P NS

相対重量：Ca  $p < 0.0001$ , P  $p < 0.05$ , Ca×P  $p < 0.05$

(b) 肝臓脂質量

脂質量：Ca  $p < 0.001$ , P  $p < 0.001$ , Ca×P NS

脂質濃度：Ca  $p < 0.001$ , P NS, Ca×P NS

NS：統計的有意差がないことを示す ( $p > 0.05$ )

細胞からの NEFA やアディポサイトカインの放出を比較した。0.1% Ca 食を摂取したラットの脂肪細胞からは 0.5% Ca 食のラットに比べて NEFA の放出が有意に高く、一方、抗インスリン抵抗性をもつアディポネクチンの放出が有意に抑制されたことを示した。そして、腸管膜脂肪細胞から多くの NEFA が放出されると肝臓において脂肪の蓄積が誘発されて肝臓重量が増大したと示唆した。

また、山中ら<sup>16)</sup>も4週齢のマウスを0.5% Ca 食、または0.1% Ca 食で73日間飼育し、

0.1% Ca 食群のマウスは0.5% Ca 食群に比べて、腹腔内脂肪組織重量の増加、肝臓脂質蓄積量の増大、血糖値、血清インスリン濃度、およびレプチン濃度の高値を報告した。さらに、0.5% Ca 食群のラットにおいて、肝臓の SREBP1-c の mRNA 発現量の低下を見出した。SREBP1-c はインスリンの支配を受け脂質合成に関与する遺伝子である。これらの結果から、Ca 摂取量の低下による腹腔内脂肪蓄積量の増加や肝臓脂質の増加は、インスリン分泌の過剰によるものと推察した。

本実験では、空腹時血漿 TG 濃度が SC 群に比べて、LC 群で有意に高かった (図2)。そして、LC 群のラットの肝臓重量が有意に増大し、肝脂質の有意な蓄積が確認された (図3)。血漿 Ca 濃度 (図1) や骨重量の結果 (表5) から推測されるように、本実験の LC 群のラットは、極度の Ca 不足の状態であることが明らかであり、PTH、活性型ビタミンDを介したCaによる脂質代謝への影響が考えられた。

さらに、最近、脂肪細胞の代謝に骨芽細胞も大きな影響をもたらすことが報告されている<sup>8)</sup>。脂肪細胞と骨芽細胞は原始細胞が同じで、両方の細胞系列の分化や機能の発現に、エネルギー代謝においてキーホルモンとなっている成長ホルモンが関与していることも報告された。そして、骨芽細胞が分泌するオステオカルシンは脾臓のβ細胞の増殖を促進し、末梢細胞のインスリン感受性を向上させること、血中オステオカルシン濃度とアディポネクチン濃度は正の相関関係にあることなど、オステオカルシンのホルモン様作用が報告されている<sup>8)</sup>。

本実験では、LP 群の血漿 NEFA 濃度が有意に高く、特に成長期の実験1において著しい高値を示した。血漿 NEFA 濃度が高くなると、脂肪細胞からインスリン抵抗性を示す TNF- $\alpha$  の分泌が高まることも知られている。そして、骨重量は低Ca食だけではなく、低

たんぱく質食でさらに著しい低値を示した。これらのことから、低たんぱく質食によるたんぱく質の不足は、Ca 不足が引き起こす脂質代謝異常をさらに増悪させた可能性が考えられた。

このように、幼仔期からの長期にわたる Ca とたんぱく質の摂取不足は、動物の成長に著しい悪影響を及ぼすだけではなく、肝臓への脂質の沈着、脂質代謝異常等を引き起こし、メタボリックシンドローム発症のリスクを高める可能性が明らかとなった。

## 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 24650499 の助成を受けて実施したものである。

カゼイン等、ラットの飼料原料を提供頂いた株式会社明治に厚くお礼申し上げます。

また、本研究において、実験動物の飼育および分析に多大な尽力を頂いた当研究室の氏家光穂氏、大沼早希氏、三師卓巳氏、岡辻珠美氏、小野文子氏、太田里沙氏、菅野未来香氏、今野希美氏に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 平成 20 年国民健康・栄養調査報告：厚生労働省 (平成 23 年 1 月)
- 2) 平成 18 年国民健康・栄養調査報告：厚生労働省 (平成 21 年 1 月)
- 3) Klish WJ. Childhood obesity: Pathophysiology and treatment. *Acta Paediatr Jpn* 37, 1-6 (1995)
- 4) S.J.Parikh and J.A.Yanovski, Calcium intake and adiposity. *Am.J.Clin. Nutr.* 77, 281-287 (2003)
- 5) M.B.Zemel, W.Thompson, A. Milstead, K. Morris, and P. Compbell, Calcium and Dairy Acceleration of Weight and Fat Loss during Energy Restriction in Obese Adult. *OBESITY RESEARCH* Vol 12, No4, 582-590 (2004)
- 6) G. Barba, E. Troiano, P. Russo, A. Venezia and A. Siani, Inverse association between body mass and frequency of milk consumption in children. *Br.J.Nutr.*, 93, 15-19 (2005)
- 7) M.B.Zemel and S. L. Miller, Dietary Calcium and

- Dairy Modulation of Adiposity and Obesity Risk. *Nutrition Reviews*, vol.62, No4, 125-131 (2004)
- 8) D. Teegarden, The Influence of Dairy Product Consumption on Body Composition. *J.Nutr.*, 135 (12), 135 (12), 2749-2752 (2005)
  - 8) I.Kanazawa, T. Yamaguchi, M. Yamamoto, M. Yamauchi, S. Kurioka, S. Yano, and T. Sugimoto, Serum Ostrocalcin Level Is Associated with Glucose Metabolism and Atherosclerosis Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 45-49 (2009)
  - 9) 平成 19 年国民健康・栄養調査報告：厚生労働省 (平成 22 年 3 月)
  - 10) P. G. Reeves, F. H. Nielsen and G. C. Fahey JR., AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 123: 1939-1951, (1993)
  - 11) Folch J, Lees M, Sloane Sanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957 May;226 (1) : 497-509.
  - 12) Papakonstantinou E.,Flatt WP., Huth PJ.,Harris RB. High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obes Res.* 11:387-394 (2003)
  - 13) M. B. Zemel, Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (suppl) : 907s-912s (2004)
  - 14) M. B. Zemel, The role of dairy foods in weight management. *J. Am. Coll. Nutr.* vol24, No6, 537s-546s (2005)
  - 15) A.Shinoki and H.Hara, Calcium deficiency in the early stages after weaning is associated with the enhancement of a low level of adrenaline-stimulated lipolysis and reduction of adiponectin release in isolated rat mesenteric adipocytes. *Metabolism*, 59 (7), 951-958 (2010)
  - 16) 山中千恵美、池上幸江、青江誠一郎、カルシウムの摂取量および形態の違いがKK マウスの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響：日本栄養・食糧学会誌 64. 6. 385-391 (2011)